

## **Analisis Sekuen Probe Gena *Shiga Like Toxin-2* dari Isolat Lokal *Escherichia coli* O157:H7**

(*PROBE SEQUANCE ANALYSIS OF SHIGA LIKE TOXIN-2 GEN  
FROM ESCHERICHIA COLI O157:H7 LOCAL ISOLATES*)

**I Wayan Suardana<sup>1</sup>, I Nengah Sujaya<sup>2</sup>, Wayan Tunas Artama<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,  
Jln. Sudirman, Denpasar, Bali Tlp.(0361) 223791, 701808  
E-mail : iwayansuardana22@yahoo.com

<sup>2</sup>Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat,  
Fakultas Kedokteran, Unud, Denpasar

<sup>3</sup>Bagian Biokimia, FKH, Univesitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### **ABSTRAK**

*Shiga-like toxin* (*stx*) dari *Escherichia coli* O157:H7 yang telah ditemukan pada feses sapi, feses manusia dan daging sapi, mengindikasikan keberadaan bakteri tersebut sebagai agen zoonosis sangat membahayakan dan mengancam kehidupan. Mengingat pentingnya keberadaan *E.coli* O157:H7 tersebut terhadap kesehatan masyarakat, menjadikan analisis keragaman genetik *Shiga Toxin Escherichia coli* (STEC) serta pengembangan perangkat diagnostik seperti *probe* gena menjadi sangat penting dilakukan. Penelitian diawali dengan tahapan amplifikasi gen *stx2*, purifikasi gel hasil elektroforesis, sekuensing gena *stx2*, analisis filogenetik dan diakhiri dengan analisis sekuen kandidat probe diagnostik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat lokal *E.coli* O157:H7 SM25(1) hasil isolasi feses sapi memiliki struktur genetik yang homolog dengan isolat *E.coli* O157:H7 kontrol positif ATCC 43894. Hasil analisis kandidat *probe* berhasil merancang *probe* dengan pelabelan teknik PCR yang memiliki susunan primer *forward* 5'-AATTTATATGTGGCCGGGTTTC-3' dan primer *reverse* 5'-TGACGACTGATTTGCATTTC-3' yang diberi nama masing-masing sebagai primer PFS dan PRS, dengan panjang produk probe 176 bp.

Kata kunci : *E.coli* O157:H7, biologi molekuler, *probe*, gena *stx2*.

### **ABSTRACT**

A Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 was detected in faecal samples of cattle, and human as well as in beef. The performance of agent indicated that it has been identified as harmful and often life-threatening zoonotic agent. It is therefore important to analysed the genetic characteristic of Shiga toxin *Escherichia coli* (STEC) and to develop a diagnostic probe in order to optimized of diagnostic test for the agent. The study was started by amplifying *stx2* gene, purifying of PCR product, sequencing of *stx2* gene, analyzing of phylogenetic tree, and finally by analyzing of diagnostic probe candidate. Homology study showed that the genetic sequence of the local isolate of *E. coli* O157:H7 i.e SM25(1) isolated from cattle feces has a genetic and fuctional similarity with the control isolate i.e *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 originated from human. Further study showed that a probe with *forward* primer sequence of 5'-AATTTATATGTGGCCGGGTTTC-3' which were respectively designed as a PFS and PRS 176 bp product. Appeared to be potential candidate of diagnostic probe for the agent.

Key words: *E.coli* O157:H7, molecular biology, *probe*, *stx2* gene.

## PENDAHULUAN

Berbagai teknik diagnostik secara molekuler dalam beberapa dekade belakangan ini, telah digunakan dalam memantau *foodborne pathogen* untuk tujuan perlindungan masyarakat (Moon *et al.*, 2004). Metode deteksi yang didasarkan atas *polymerase chain reaction/PCR* merupakan suatu metode yang sangat membantu karena spesifisitas yang tinggi serta cara penggunaannya yang sederhana. Gen target yang digunakan sebagai *marker* untuk dideteksi dengan teknik PCR biasanya terkait dengan faktor virulensi dari mikroorganisme patogen seperti gen *rfb*, *uidA*, *stx1*, *stx2*, serta gen *eaeA* dari *E.coli* O157:H7. Selain teknik PCR, teknik diagnostik yang lebih cepat dan mudah aplikasinya sangat perlu dikembangkan. Salah satu teknik tersebut adalah pengembangan teknik diagnostik dengan menggunakan *probe*. *Probe* secara kimiawi dan biologis merupakan suatu molekul yang hanya dapat berinteraksi secara kuat dengan molekul targetnya yaitu ikatan yang kuat antara basa C dengan G dan A dengan T, seperti halnya ikatan antara antigen dengan antibodi, ikatan antara avidin dan biotin ataupun ikatan antara lateks dengan karbohidrat (Reischel *et al.*, 2003). Lebih lanjut Hill dan Jinneman (2000), menyatakan bahwa, di samping keunggulan *probe* yang dapat mempercepat deteksi suatu strain bakteri dan/atau gen virulensi, pengembangan *probe* gena juga dapat mengurangi penggunaan media pertumbuhan ataupun hewan coba. Bertitik tolak dari permasalahan tersebut, analisis kandidat *probe* gena *shiga like toxin-2 (stx2)* dari isolat lokal *E. coli* O157:H7 ini menarik untuk dilakukan.

## METODE PENELITIAN

### Kultivasi Stok Isolat

Kultivasi terhadap sembilan isolat stok (tersimpan dalam gliserol 30% dengan suhu penyimpanan -20°C), yang terdiri dari satu isolat kontrol positif yaitu O157:H7 ATCC 43894, dua isolat lokal asal tinja manusia normal yaitu M17(1) dan M15(1), tiga isolat lokal asal tinja sapi yaitu SM23(2), SM25(1) dan SM 7(1), serta tiga isolat lokal asal daging sapi yaitu DB24, DS 21(4) dan DS 12(2). Keseluruhan isolat ditumbuhkan kembali pada media selektif

*Sorbitol MacConkey Agar* (SMAC) (Oxoid CM 0813), yang dilanjutkan dengan uji konfirmasi menggunakan uji *E. coli* O157 *latex agglutination test* (Oxoid DR620 M). Isolat yang tidak memfermentasi sorbitol pada uji SMAC dan positif pada uji lateks, selanjutnya dibiakkan pada agar *nutrient* miring sebagai stok isolat untuk isolasi DNA.

### Isolasi DNA Genomik Bakteri

Tahap isolasi DNA genomik bakteri mengacu pada prosedur Qiagen (2007). Sebanyak sembilan isolat *E.coli* O157:H7 yang sebelumnya telah diinokulasikan pada media penyubur *lactose broth* (LB) dipanen dengan cara sentrifugasi 7500 rpm selama 5 menit. Pelet sel ditambah 180 µL *tissue lysis buffer* (Bufer ATL) dan 20 µL larutan proteinase K, selanjutnya divortek selama 15 detik. Larutan ditambah 200 µL *lysis buffer* (Buffer AL), divortek selama 15 detik, diinkubasikan pada *waterbath* suhu 56°C selama 10 menit, ditambahkan 200 µL etanol absolut 96-100%, dan divortek selama 15 detik. *Lysate E. coli* yang didapat digunakan untuk *binding* DNA. *Lysate* dimasukkan ke dalam tabung mikro penyaring yang terletak dalam tabung 2 mL (*QIAamp mini spin column*) dan disentrifus 8000 rpm selama satu menit. Sisa cairan dibuang, dan filter yang telah mengandung DNA dimasukkan ke dalam tabung 2 mL (Nunc, Inc) yang baru dan berlanjut ke tahapan *washing* DNA. Filtrat DNA ditambah 500 µL *wash buffer* (buffer AW1), didiamkan selama lima menit, dan disentrifus 8000 rpm selama satu menit. Sisa cairan tertampung dibuang dan tabung penampung diganti dengan tabung 2 mL yang baru. Sebanyak 500 µL *wash buffer* (buffer AW2) ditambahkan dan didiamkan selama lima menit. Tabung disentrifus dengan kecepatan penuh 14.000 rpm selama tiga menit. Sisa cairan yang tertampung dibuang dan dilanjutkan untuk *eluting* DNA. *QIAamp mini spin column* yang mengandung DNA dimasukkan ke dalam tabung steril baru, ditambahkan 50 µL *elution buffer* (buffer AE), didiamkan pada suhu kamar selama lima menit, dan disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama satu menit (tabung telah mengandung larutan DNA murni). Untuk menghindari pengulangan *freezing* dan *thawing*, DNA murni disimpan pada 4°C untuk uji selanjutnya.

### Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA

Sampel DNA diencerkan 50 kali (2  $\mu$ L DNA dicampur dengan 98  $\mu$ L *distilled water*) dan konsentrasi DNA diukur *optical density* (OD)-nya dengan menggunakan spektrofotometer (Backman DU-65) pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Konsentrasi DNA dihitung dengan menggunakan rumus seperti yang dilaporkan oleh Sambrook dan Russel (2001).

### Deteksi Gen *Shiga Like Toxin-2 (stx-2)* dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Deteksi keberadaan gen *shiga like toxin-2* terhadap sembilan isolat dilakukan menggunakan primer spesifik LP-43(F): (5'-ATCCTATTCGCGGGAGTTACG-3') dan LP-44 (R): (5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3') dengan panjang produk PCR 584 bp (Moon *et al.*, 2004). Reaksi PCR dilakukan pada total volume 41  $\mu$ L yang mengandung 1,5  $\mu$ L DNA *template*, 36,5  $\mu$ L PCR Platinum PCR SuperMix 2x (Invitrogen Cat.No. 11306-016), 1,5  $\mu$ L (20 pmol/ $\mu$ L) primer LP-43 dan 1,5  $\mu$ L (20 pmol/ $\mu$ L) primer LP-44. Amplifikasi dilakukan pada mesin *Thermalcycler Model TC25/H* dengan kondisi *predenaturasi* pada suhu 94°C selama tujuh menit, diikuti 35 siklus dengan kondisi reaksi *denaturasi* 94°C selama satu menit, *annealing* pada 60°C selama 35 detik, dan *polimerisasi* pada suhu 72°C selama dua menit. Pada bagian akhir dilakukan *polimerisasi* tambahan pada suhu 72°C selama lima menit. Setelah reaksi selesai, sebanyak 4  $\mu$ L produk PCR dicampur dengan 2  $\mu$ L *loading dye* (*blue/orange loading dye*) dan dielektroforesis pada gel agarose 1% (Gibco BRL Cat. No. 5510UA) yang telah diisi *GoldView™ Nucleic Acid Stain* 5 mL/ 30 mL agar, bersama dengan *marker* 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen Cat.No. 10380-012). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100V selama 35 menit. Visualisasi pita/*band* yang muncul dilakukan dengan *UV transilluminator* dan difoto dengan kamera digital FE-270 7,1 Megapixel.

### Purifikasi Produk Amplifikasi DNA

Purifikasi produk amplifikasi gen *stx2* dilakukan dengan metode *pureLink™ quick gel extraction kit* (Invitrogen Cat.No. K2100-12). Pita DNA hasil elektroforesis yang positif fragmen yang diinginkan (584 bp) diiris di atas UV. Ketentuan jika gel agarose < 2% maka ditambahkan tiga volume *gel solubilization*

*buffer* (L3) untuk setiap satu volume gel atau 1,2 ml *gel solubilization buffer* (L3) untuk 400 mg gel. Campuran diinkubasikan dalam *waterbath* suhu 50°C selama 10 menit sampai semua irisan gel terlarut. Waktu inkubasi ditambahkan lima menit setelah semua gel terlarut. Larutan gel dipindah ke dalam *quick gel extraction column* yang sudah terdapat dalam tabung *washing*. Tabung selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 12.000 x g selama satu menit. Setelah sentrifus, ke dalam *tabung* ditambahkan 500  $\mu$ L *washing buffer* (W1) yang telah mengandung etanol, kemudian di sentrifus dengan kecepatan 12.000 x g selama satu menit. Sisa cairan dibuang dan tabung disentrifus lagi dengan kecepatan 12.000 x g selama tiga menit untuk menghilangkan sisa *washing buffer* dan etanol. *Quick gel extraction column* dipindahkan ke *tabung recovery* yang baru, selanjutnya ditambahkan 30  $\mu$ L *elution buffer* (E5) dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 1 menit. Tahapan terakhir adalah melarutkan DNA dengan cara sentrifus pada kecepatan 12.000 rpm selama satu menit.

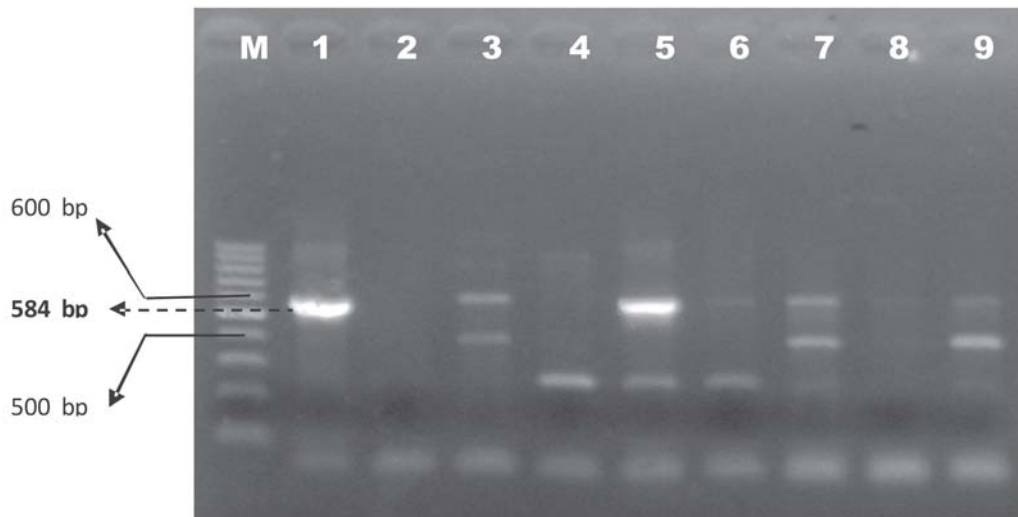
### Sekuensing dan Analisis Sekuen Kandidat *Probe*

Sekuensing DNA dikerjakan di Lembaga Eijkman Jakarta. Sekuensing dilakukan pada dua sampel dengan pita terbaik menggunakan primer *forward* dan *reverse*. Data sekuensing yang diperoleh, dianalisis dengan program Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Analisis sekuen nukleotida dan asam amino dari isolat yang terpilih *dialignment* dengan data yang ada di *gen bank* melalui program Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) yang ada di *software* Mega versi 4.0. Hubungan evolusi ditentukan berdasarkan metode *Neighbor-Joining* dengan 1000 kali pengulangan (Saitou dan Nei, 1987). Struktur sekuen primer kandidat *probe* dipilih susunan nukleotida yang memenuhi syarat untuk menghasilkan *probe* dengan panjang > 100 nukleotida menggunakan program Primer3.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Deteksi Gen *stx-2* dari *Escherichia coli* O157:H7

Hasil deteksi gen *stx2* menggunakan primer spesifik LP-43(F) dan LP-44 (R) terhadap isolat *E.coli* O157:H7 seperti tersaji pada Gambar 1.



Gambar 1 Elektroforesis produk PCR 8 Isolat *E.coli* O157:H7 dan 1 isolat kontrol pada agarose 1%. Baris 1 kontrol positif : ATCC 43894; baris 2-3 isolat asal feses manusia yaitu baris 2: M17(1) dan baris 3: M15(1); baris 4-6 isolat asal feses sapi yaitu baris 4: SM23(2); baris 5: SM25(1); dan baris 6: SM7(1); baris 7-9 isolat asal daging sapi yaitu baris 7: DB24; baris 8: DS21(4) dan baris 9: DS12(2). M: Marker 100 bp DNA Ladder (Microzone Ltd).

Hasil PCR menunjukkan bahwa isolat asal feses manusia [M15(1)], feses sapi [SM25(1) dan SM7(1)], serta asal daging sapi [DB24 dan DS12(2)] mengandung gen *stx2* dari agen *E. coli* O157:H7 seperti halnya isolat kontrol positif ATCC 43894 yang dicirikan dengan terlihatnya produk PCR 584 bp (Gambar 1). Namun, pita yang paling jelas adalah isolat ATCC43894 dan SM25(1) asal feses sapi. Pita-pita tambahan pada isolat lainnya dapat disebabkan oleh kurang optimumnya suhu dan waktu PCR saat amplifikasi (khususnya pada suhu *annealing*), atau dapat diakibatkan jumlah siklus yang terlalu banyak, ataupun kurang spesifiknya desain primer yang digunakan (Roche, 2006). Tahapan selanjutnya berupa sekuensing pada isolat SM25(1) untuk mengetahui lebih jauh susunan nukleotida penyusunnya. Teknik sekuensing mengacu pada pendapat Foley *et al.*, (2004) yang menyatakan bahwa sekuensing DNA menjadi metode yang sangat akurat untuk mengetahui susunan nukleotida gen *stx2* dari *E. coli* O157:H7 karena kemampuan pengurutan materi genetiknya yang tinggi dan merupakan instrumen pembeda yang sangat akurat.

#### Analisis Hasil Sekuensing Gen *stx2*

Hasil *alignment* 583 nukleotida hasil sekuensing isolat ATCC 43894 dan SM25(1) terhadap isolat lain memperlihatkan bahwa gen *stx2* dari isolat lokal *E. coli* O157:H7 SM25(1)

memiliki homologi susunan nukleotida yang tinggi (identik) terutama dengan gen *stx2* dari isolat kontrol O157:H7 ATCC 43894 dan paga 933W namun memperlihatkan beberapa nukleotida yang berbeda jika dibandingkan dengan strain *E. coli* O157:H7 Thai-1, *E. coli* O157:H7 Thai-12, serta *E. coli* O157:H7 98-16 (Tabel 1).

Hasil *alignment* isolat ATCC 43894 dan SM25(1) dengan strain *referen* terakhir ini menunjukkan adanya substitusi transisi dan tranversi yakni enam situs substitusi transisi (urutan basa ke-21, 42, 303, 318, 381, dan 462) dan satu situs substitusi tranversi (urutan basa ke-57). Hasil *alignment* juga menunjukkan adanya situs beragam yakni substitusi transisi basa ke 21 dan ke-42, serta substitusi tranversi basa ke-57 dapat digunakan sebagai pembeda antara isolat *E. coli* SM25(1) dengan *E. coli* O157:H7 Thai-1, *E. coli* O157:H7 Thai-12, serta *E. coli* O157:H7 98-16. Kajian lebih jauh untuk melihat adanya pengaruh mutasi nukleotida terhadap susunan asam amino, dikaji lebih jauh dengan melakukan *alignment* yang didasarkan atas susunan asam amino seperti tersaji pada Tabel 2. *Alignment* terhadap susunan asam amino sangat penting dilakukan mengingat adanya mutasi dari nukleotida pada daerah *coding sequence*, dikhawatirkan akan berpengaruh terhadap fungsi dari protein yang dibentuknya (Dale dan Park, 2004)

Tabel 1. *Alignment* susunan nukleotida (berukuran 583 nt) hasil sekuensing gen *stx2 E.coli* ATCC 43894 dan SM25(1) terhadap isolat lainnya di *Genbank* dengan program Clustal W

#Phage_933W	TCG	GTA	TCC	TAT	TCC	CGG	GAG	TTT	ACG	ATA	GAC	TTT	TCG	[ 39]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	[ 39]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	[ 39]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	[ 39]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 39]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 39]
#Phage_933W	ACC	CAA	CAA	AGT	TAT	GTC	TCT	TCG	TTA	AAT	AGT	ATA	CGG	[ 78]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	..T	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	..T	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]
#E.coli_O157:H7_98-16	..T	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]
#Phage_933W	ACA	GAG	ATA	TCG	ACC	CCT	CTT	GAA	CAT	ATA	TCT	CAG	GGG	[117]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[117]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[117]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[117]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[117]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[117]
#Phage_933W	ACC	ACA	TCG	GTG	TCT	GTT	ATT	AAC	CAC	ACC	CCA	CCG	GGC	[156]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[156]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[156]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[156]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[156]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[156]
#Phage_933W	AGT	TAT	TTT	GCT	GTG	GAT	ATA	CGA	GGG	CTT	GAT	GTC	TAT	[195]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[195]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[195]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[195]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[195]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[195]
#Phage_933W	CAG	GCG	CGT	TTT	GAC	CAT	CTT	CGT	CTG	ATT	ATT	GAG	CAA	[234]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[234]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[234]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[234]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[234]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[234]
#Phage_933W	AAT	AAT	TTA	TAT	GTG	GCC	GGG	TTC	GTT	AAT	ACG	GCA	ACA	[273]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[273]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[273]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[273]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[273]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[273]
#Phage_933W	AAT	ACT	TTC	TAC	CGT	TTT	TCA	GAT	TTT	ACA	CAT	ATA	TCA	[312]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	[312]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[312]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[312]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[312]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[312]
#Phage_933W	GTG	CCC	GGT	GTG	ACA	ACG	GTT	TCC	ATG	ACA	ACG	GAC	AGC	[351]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[351]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[351]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[351]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[351]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[351]
#Phage_933W	AGT	TAT	ACC	ACT	CTG	CAA	CGT	GTC	GCA	GCG	CTG	GAA	CGT	[390]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	[390]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[390]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[390]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[390]
#E.coli_SM25(1)	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[390]
#Phage_933W	TCC	GGA	ATG	CAA	ATC	AGT	CGT	CAC	TCA	CTG	GTT	TCA	TCA	[429]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[429]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[429]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[429]
#E.coli_ATCC_43894	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[429]

#E.coli_SM25(1)	...	[429]
#Phage_933W	TAT CTG GCG TTA ATG GAG TTC AGT GGT AAT ACA ATG ACC	[468]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	[468]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	[468]
#E.coli_O157:H7_98-16	...G	[468]
#E.coli_ATCC_43894	...	[468]
#E.coli_SM25(1)	...	[468]
#Phage_933W	AGA GAT GCA TCC AGA GCA GTT CTG CGT TTT GTC ACT GTC	[507]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	[507]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	[507]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	[507]
#E.coli_ATCC_43894	...	[507]
#E.coli_SM25(1)	...	[507]
#Phage_933W	ACA GCA GAA GCC TTA CGC TTC AGG CAG ATA CAG AGA GAA	[546]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	[546]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	[546]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	[546]
#E.coli_ATCC_43894	...	[546]
#E.coli_SM25(1)	...	[546]
#Phage_933W	TTT CGT CAG GCA CTG TCT GAA ACT GCT CCT GTG TAT A	[583]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	...	[583]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	...	[583]
#E.coli_O157:H7_98-16	...	[583]
#E.coli_ATCC_43894	...	[583]
#E.coli_SM25(1)	...	[583]

Tabel 2. *Alignment* susunan asam amino (berukuran 194 Asam amino) hasil sekuensing gen *stx2* *E.coli* ATCC 43894 dan SM25(1) terhadap isolat lainnya di *Genbank* dengan program Clustal W

#Phage_933W	SVSYSREFTI DFSTQQSYVS SLNSIRTEIS TPLEHISQGT	[ 40]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	.....	[ 40]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	.....	[ 40]
#E.coli_O157:H7_98-16	.....	[ 40]
#E.coli_ATCC_43894	.....	[ 40]
#E.coli_SM25(1)	.....	[ 40]
#Phage_933W	TSVSVINHTP PGSYFAVDIR GLDVYQARFD HLRLIEQNN	[ 80]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	.....	[ 80]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	.....	[ 80]
#E.coli_O157:H7_98-16	.....	[ 80]
#E.coli_ATCC_43894	.....	[ 80]
#E.coli_SM25(1)	.....	[ 80]
#Phage_933W	LYVAGFVNTA TNTFYRFSDF THISVPGVTT VSMTTDSSYT	[120]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	.....	[120]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	.....	[120]
#E.coli_O157:H7_98-16	.....	[120]
#E.coli_ATCC_43894	.....	[120]
#E.coli_SM25(1)	.....	[120]
#Phage_933W	TLQRVAALER SGMQISRHSL VSSYLALMEF SGNTMTRDAS	[160]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	.....	[160]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	.....	[160]
#E.coli_O157:H7_98-16	.....	[160]
#E.coli_ATCC_43894	.....	[160]
#E.coli_SM25(1)	.....	[160]
#Phage_933W	RAVLRFVTVT AEALRFQIQ REFRQALSET APVY	[194]
#E.coli_O157:H7_Thai-1	.....	[194]
#E.coli_O157:H7_Thai-12	.....	[194]
#E.coli_O157:H7_98-16	.....	[194]
#E.coli_ATCC_43894	.....	[194]
#E.coli_SM25(1)	.....	[194]

Hasil *alignment* 194 asam amino pada Tabel 2 memperlihatkan adanya kesamaan susunan asam amino penyusun toksin *Stx2* antara isolat ATCC 43894 dan SM25(1) terhadap isolat lainnya yang ada di *Genbank*. Hasil ini menjelaskan bahwa sekalipun pada tingkat nukleotida terlihat adanya mutasi (transisi maupun tranversi), namun mutasi yang terjadi hanya bersifat *silent mutation* yakni mutasi yang tidak sampai menimbulkan adanya perubahan asam amino, sehingga diprediksi tidak sampai mengubah fungsi dari gen *stx2*. Kodon dengan pola seperti itu, menurut Dale dan Park (2004) dikenal dengan istilah *synonymous codons*.

Kajian lebih lanjut untuk melihat jarak genetik di antara masing-masing isolat, seperti tersaji pada Tabel 3.

Adanya perbedaan susunan nukleotida tersebut diperjelas dengan hasil filogram pada Gambar 2. Hasil filogram mengelompokkan isolat SM 25(1) ke dalam satu *clade* bersama-sama dengan *E.coli* ATCC 43894 dan phaga 933W. Di sisi lain, *E. coli* O157:H7 Thai-12 membentuk *clade* yang terpisah bersama-sama dengan *E.coli* O157:H7 Thai-1 dan *E. coli* O157:H7 98-16.

Terjadinya pengelompokan isolat SM25(1) dengan isolat kontrol ATCC 43894 dan phaga 933W ke dalam satu *clade* yang didukung oleh nilai *bootstrap* 94% mengindikasikan adanya kesesuaian yang erat termasuk daya patogenisitas *stx2* yang dimilikinya.

Tabel 3. Matriks perbedaan nukleotida (berukuran 583 nt) hasil sekuensing gen *stx2* *E.coli* ATCC 43894 dan SM25(1) terhadap isolat lainnya di *gen bank* menggunakan metode Kimura 2 parameter.

[1] #Phage\_933W  
 [2] #E.coli\_O157:H7\_Thai-1  
 [3] #E.coli\_O157:H7\_Thai-12  
 [4] #E.coli\_O157:H7\_98-16  
 [5] #E.coli\_ATCC\_43894  
 [6] #E.coli\_SM25(1)

[	1	2	3	4	5	6]
[1]						
[2]	0.009					
[3]	0.005	0.003				
[4]	0.009	0.007	0.003			
[5]	0.000	0.009	0.005	0.009		
[6]	0.000	0.009	0.005	0.009	0.000	

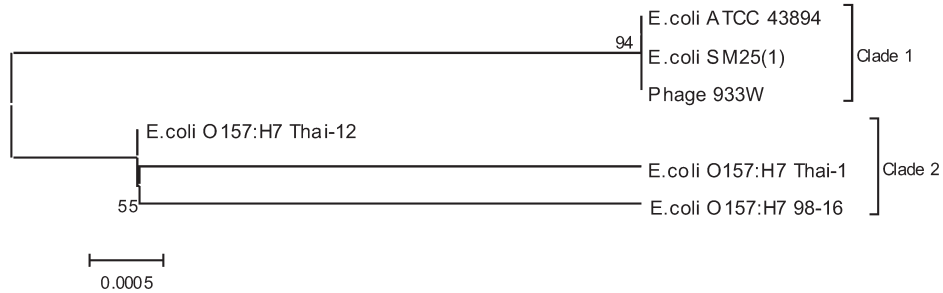
Koitaishi *et al.*, (2006) menemukan adanya perbedaan daya patogenisitas yang nyata antara phaga 933W yang terisolasi dari wabah *E.coli* O157:H7 pertama di Amerika dibandingkan dengan phaga 21 yang memiliki homologi yang tinggi dengan *strain* Thai-12. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sejumlah besar toksin *Stx2* cenderung terdeteksi pada phaga 933W jika dibandingkan dengan phaga 21. Fenomena ini mengindikasikan bahwa *strain* lokal *E. coli* O157:H7 SM25(1) berpeluang besar memiliki daya patogenisitas yang serupa dengan phaga 933W maupun ATCC 43894, sehingga keberadaan *strain* lokal *E. coli* O157:H7 sudah semestinya mendapat perhatian bersama.

**Analisis Kandidat Probe**

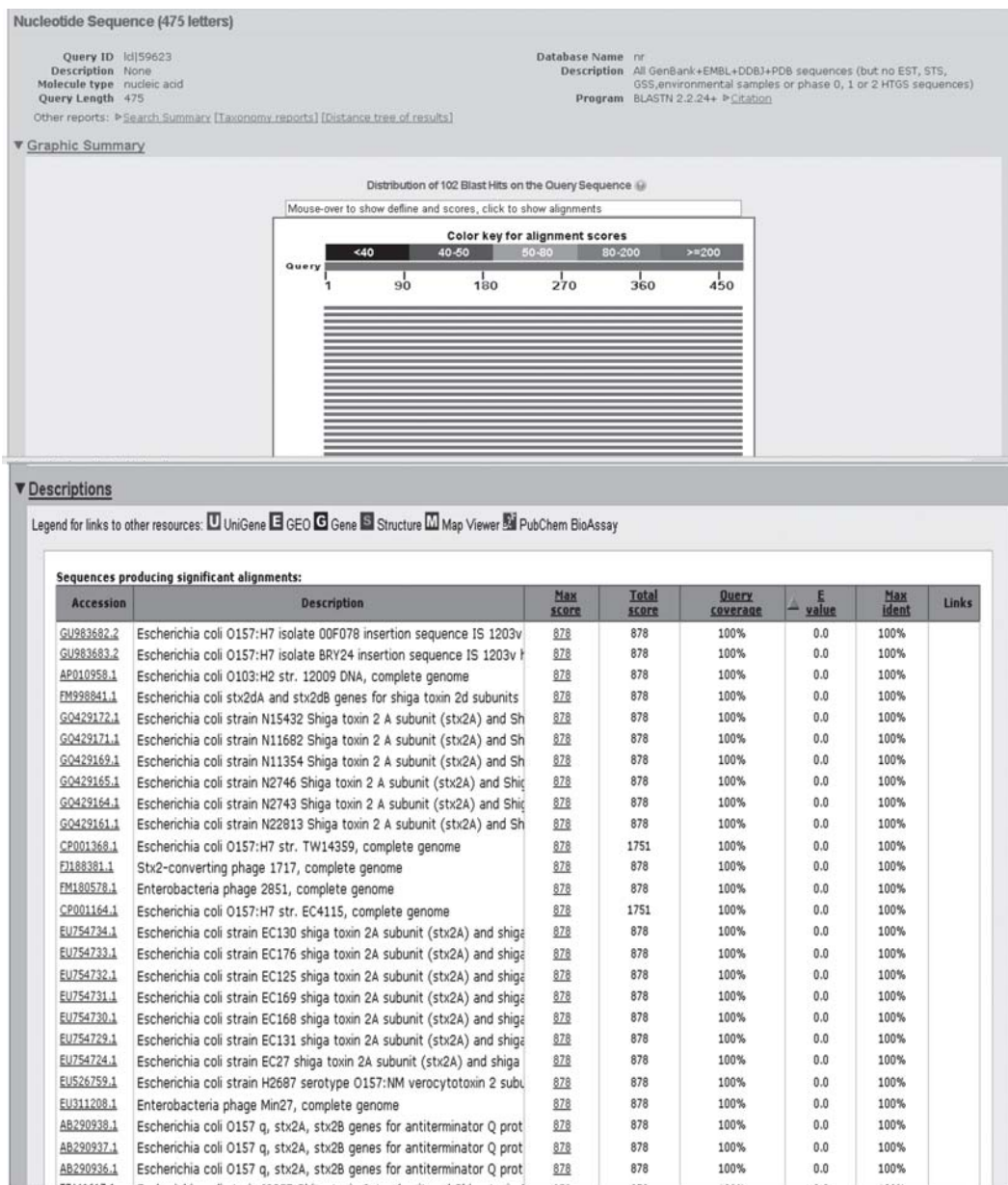
Suatu sekuen gen yang akan digunakan sebagai *template* untuk sintesis *probe* harus memiliki kestabilan yang tinggi dalam suatu organisme (Reue, 1998). Tingkat akurasi deteksi yang tinggi dari suatu *probe* dapat dicapai apabila *probe* bersifat komplemen dengan DNA atau RNA dari organisme target, sehingga sekuen tersebut harus *conserved* selama evolusi. Kestabilan gen dari suatu organisme dapat diketahui melalui pendekatan analisis *database* bioinformatika yang diakses melalui *Genbank* (Strachan dan Read, 2002). Analisis homologi dari sekuen yang akan dijadikan kandidat *probe* dilakukan dengan program *basic local alignment search tool* (BLAST) melalui situs NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> akan dapat dilakukan (Altschul *et al.*, 1997). Hasil analisis *blastn* pada program BLAST dari sekuen gen *stx2* isolat SM25(1) terhadap gen-gen lain seperti tersaji pada Gambar 3.

Hasil *blastn* memperlihatkan bahwa susunan nukleotida dari isolat SM25(1) sangat identik (100%) dengan gen *stx2* dari beberapa isolat *E. coli* terutama dari virotype O157:H7 yang sudah terdaftar di *Genbank* serta memiliki homologi yang sangat rendah dengan genom hospes (data tidak ditampilkan) sehingga sepanjang nukleotida yang disejajarkan tersebut sangat layak untuk dipilih sebagai kandidat *probe*.

Kandidat *probe* yang dirancang, dianalisis dengan menggunakan program Primer 3. Setelah memperhatikan beberapa persyaratan yang harus dipenuhi sebagai kandidat *probe*, akhirnya diperoleh susunan nukelotida yang dianggap layak sebagai primer *probe* (Gambar



Gambar 2. Filogram yang dikonstruksi berdasarkan algoritma *Neighbor joining* (Saitou dan Nei, 1987) dari nukleotida gen *stx2* (berukuran 583 bp) pada isolat *E. coli* SM25(1) dan ATCC 43894.



Gambar 3. Hasil *blastn* nukleotida hasil sekuensing gen *stx2* dari isolat SM25(1) dengan beberapa isolat *E. coli* O157:H7 di *Genbank*





▼ Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GU244510.1	Escherichia coli stx2g operon, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GU228505.1	Escherichia coli strain 99-05171 Shiga toxin Stx2gA (stx2gA) pseudoc	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GO995452.1	Escherichia coli strain 02-04450 Stx2gA (stx2gA) and Stx2gB (stx2gB)	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GO919289.1	Escherichia coli strain 05-06751 serovar O136:NM Stx2gA (stx2gA) ai	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GU983682.2	Escherichia coli O157:H7 isolate 00F078 insertion sequence IS 1203v	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GU983683.2	Escherichia coli O157:H7 isolate BRY24 insertion sequence IS 1203v	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GU945540.1	Escherichia coli strain 0607P18G verotoxin 2e subunit A and verotoxin	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GU945539.1	Escherichia coli strain 0607P28G verotoxin 2e subunit A and verotoxin	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GU945538.1	Escherichia coli strain 10077B verotoxin 2e subunit A and verotoxin 2	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GU459254.1	Escherichia coli strain 0307HT verotoxin 2e subunit A and verotoxin 2	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
GU363957.1	Escherichia coli strain 3507ND verotoxin 2e subunit A and verotoxin 2	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
AP010960.1	Escherichia coli O111:H- str. 11128 DNA, complete genome	40.1	120	100%	0.056	100%	
AP010958.1	Escherichia coli O103:H2 str. 12009 DNA, complete genome	40.1	94.6	100%	0.056	100%	
FN182287.1	Escherichia coli stx2Adact gene for shiga toxin 2d activatable subunit	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FN182286.1	Escherichia coli stx2eA gene for shiga toxin 2e subunit A and stx2eB	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FN182285.1	Escherichia coli stx2eA gene for shiga toxin 2e subunit A and stx2eB	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FN182284.1	Escherichia coli stx2eA gene for shiga toxin 2e subunit A and stx2eB	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928861.1	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928860.1	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928859.1	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928858.1	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928857.1	Escherichia coli stx2dA and stx2dB genes for shiga toxin 2d subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928856.1	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928855.1	Escherichia coli stx2dA and stx2dB genes for shiga toxin 2d subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928854.1	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928853.1	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	
FM928852.1	Escherichia coli stx2vA and stx2vB genes for shiga toxin 2v subunits	40.1	40.1	100%	0.056	100%	

Gambar 6. Hasil blast primer *reverse* dengan beberapa nukleotida di *Genbank*

4) yang diharapkan akan dapat menghasilkan *probe* terlabel lebih dari 100 basa (dalam teknik pelabelan dengan reaksi PCR).

Spesifisitas dari primer *probe* yang dirancang diukur dengan cara primer *probe* baik *forward* maupun *reverse* diuji dengan beberapa nukleotida lainnya di *Genbank*.

Hasil blast pada Gambar 5 dan 6 menunjukkan bahwa sekuen primer *probe* yang akan digunakan memiliki nilai spesifisitas 100% (*max ident*) terhadap gen *stx2* dari *E. coli* O157:H7 sekaligus memiliki nilai spesifisitas yang rendah terhadap genom inang (data tidak ditunjukkan). Berpedoman pada hasil tersebut, maka sekuen primer *probe* yakni primer *probe forward* dengan susunan 5'-AATTTATATG-TGGCCGGGTTC-3 dan primer *reverse* dengan susunan 5'-TGACGACTGATTTGCATTCC-3 yang selanjutnya diberi nama masing-masing sebagai primer PFS dan PRS dipandang sangat spesifik untuk menghasilkan daerah template dalam pembuatan *probe* diagnostik yang dilabel dengan teknik PCR.

**SIMPULAN**

Isolat SM25(1) yang merupakan isolat lokal *E. coli* O157:H7 asal feses sapi memiliki kesamaan struktur genetik yang tinggi dengan isolat O157:H7 ATCC 43894 yang diisolasi dari

feses manusia. Sekuen *probe* telah berhasil dirancang dengan susunan primer *forward* 5'-AATTTATATG-TGGCCGGGTTC-3 dan primer *reverse* 5'-TGACGACTGATTTGCATTCC-3 dengan nama masing-masing sebagai primer PFS dan PRS dapat dikembangkan sebagai perangkat diagnostik untuk menghasilkan *probe* terlabel dengan panjang produk *probe* 176 bp di dalam suatu pelabelan *probe* dengan teknik PCR.

**SARAN**

Keakuratan dari primer *probe* yang didapat masih memerlukan tahapan uji lanjutan yakni tahapan sintesis *probe*, pelabelan *probe*, kuantifikasi *probe* serta optimasi efisiensi penggunaan *probe* terlabel, sehingga *probe* yang dirancang benar-benar dapat dibuktikan daya sensitivitas dan spesifisitasnya.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada pihak LPPM-UNUD yang telah mendanai proyek penelitian ini melalui dana Penelitian Hibah Bersaing Tahap II Tahun Anggaran 2010 dengan Kontrak No : 0161/023-04.2/XX/2010 Tanggal 31

Desember 2009, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor : 1677.A.3/H14/HM/2010 Tanggal 17 Mei 2010

#### DAFTAR PUSTAKA

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zang J, Miller W, Lipwan DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Res* 25(17) : 3389-3402.
- Dale JW, Park SF. 2004. *Molecular Genetics of Bacteria*. 4<sup>th</sup>Ed. John Wiley and Sons Inc. pp: 346.
- Foley SL, Simjee S, Meng J, White DG, McDermott PF, Zhao S. 2004. Evaluation of Molecular Typing Methods for *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Cattle, Food, and Humans. *J Food Protection* 67(4) : 651-657.
- Hill WE, Jinneman KC. 2000. Principles and Application of Genetic Techniques for Detection, Identification, and subtyping of Food-Associated Pathogenic Microorganism in *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol. II (ed) Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Koitaishi T, Vuddhakul V, Radu S, Morigaki T, Asai, Nakaguchi N, Nishibuchi M. 2006. Genetic Characterization of *Escherichia coli* O157:H7/- Strains Carrying the *stx2* Gene but Not Producing Shiga Toxin 2. *Microbiol Immunol* 50(2) : 135-148.
- Moon G, Kim WJ, Shin WS. 2004. Optimization of Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by PCR and Application to Field Test. *J Food Protection* 67(8) : 1634-1640.
- Qiagen. 2007. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 2<sup>nd</sup> Ed. Sample & Assay Technologies.
- Reischel U, Bretagna S, Kruger D, Ernault P, Costa JM. 2003. Comparison of Two DNA Target for The Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Hybridization Probe. *BMC. Inf Dis* 3(1) : 7
- Reue K. 1998. mRNA Quantitation Techniques: Considerations for Experimental Design and Application. *J Nutr* 128(11) : 244-250.
- Roche. 2006. *FastStart PCR Master*. Roche Diagnostics GmbH. Roche Applied Science 68298 Mannheim Germany.
- Saitou N, Nei M. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 : 406-425.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup>ED. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Strachan T, Read AP. 2002. *Human Molecular Genetics 2*. John Willey and Sons Inc: USA.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 10 : 1093.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: Improving The Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res* 22 : 4673-4680.